



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Patentschrift
⑯ DE 195 21 046 C 1

⑯ Int. Cl. 6:
C 12 N 15/55

C 12 N 15/63
C 12 N 9/22
C 12 N 5/10
C 12 N 1/00
C 07 K 16/40
A 61 K 38/46
A 61 K 31/70
A 61 K 39/395
// C12Q 1/44, G01N
33/50, 33/53

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Patentinhaber:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑯ Vertreter:

Müller-Boré & Partner, 81671 München

⑯ Erfinder:

Zantgraf, Hanswalter, Dr., 69115 Heidelberg, DE;
Poustka, Annemarie, Dr., 69120 Heidelberg, DE; Coy,
Johannes, 83762 Großostheim, DE; Velhagen, Iris,
Dr., 68723 Schwetzingen, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

NICHTS ERMITTELT

⑯ Protein mit DNase-Aktivität

⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein mit DNase-Aktivität, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

DE 195 21 046 C 1

DE 195 21 046 C 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein mit DNase-Aktivität, eine ein solches kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

Es ist bekannt, daß viele Zellen einen programmierten Zelltod erleiden. Dieser Zelltod wird mit Apoptose bezeichnet. Er findet sich z. B. bei der Organentwicklung und Metamorphose, der Gewebeatrophie und Tumorentzerrung. Apoptose ist mit einer Kondensation des Cytoplasmas, einem Verlust von Plasmamembranvilli, einer Segmentation des Kerns und insbesondere einem extensiven Abbau chromosomaler DNA verbunden. Letzteres zeigt sich darin, daß in apoptotischen Zellen eine "Leiter" von DNA-Fragmenten, insbesondere der Größe von mehr als 600 kb, 50–300 kb und 50 kb, vorliegt. Bisher ist nicht bekannt, welche Mechanismen für den Abbau der chromosomal DNA verantwortlich sind. Dies wäre aber notwendig, um Apoptose besser verstehen und gegebenenfalls Maßnahmen für oder gegen sie ergreifen zu können.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der Abbau chromosomaler DNA in apoptotischen Zellen untersucht werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Bereitstellung der Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protein mit DNase-Aktivität, das die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder ein funktionelles Derivat oder Fragment davon umfaßt.

Der Ausdruck "DNase-Aktivität" weist darauf hin, daß das Protein einzel- und/oder doppelsträngige DNA schneiden kann.

Der Ausdruck "funktionelles Derivat oder Fragment" umfaßt jegliches Derivat oder Fragment der Aminosäuresequenz von Fig. 1, das eine DNase-Aktivität aufweist. Auch kann die Aminosäuresequenz von Fig. 1 Additionen, Substitutionen und/oder Deletionen von ein oder mehreren Aminosäuren aufweisen, was auch für die funktionellen Derivate oder Fragmente davon gilt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Protein kodierende Nukleinsäure. Dies kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z. B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Die beanspruchte DNA umfaßt folgendes:

- (a) die DNA von Fig. 1 oder einen Teil davon,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 1 wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als JFC4 unter DSM 9993 am 23. Mai 1995 hinterlegt.

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer Cosmid-Bibliothek, z. B. q1Z (vgl. Dietrich, A. et al, Nucleic Acids Res. 19, (1991), 2567–2572) auszugehen, von der Klonen die Region Xq27.3-Xqter des menschlichen Genoms umfassen. Solche Klonen werden auf einer Filtermembran fixiert und mit markierten, aus mRNA von Schweinegeweben, z. B. Gehirn, Muskel, Leber, durch reverse Transkription erhaltenen cDNA-Pools hybridisiert (vgl. Coy, J.F. et al, Mammalian Genome 5, (1994) 131–137). Diejenigen Klonen, die mit den cDNA-Pools ein Hybridisierungssignal aufweisen, werden zum Screening einer menschlichen cDNA-Bibliothek, z. B. von fötalem Gehirngewebe, verwendet. Hierfür eignet sich besonders die cDNA-Bibliothek λ-Zap, StrataGene, Kat.-Nr. 936206. Es wird eine erfindungsgemäße cDNA erhalten.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z. B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Hefe sind z. B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z. B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, wobei letzterer bevorzugt ist, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fu-

sions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein bevorzugter Antikörper der vorliegenden Erfindung, nämlich der monoklonale Antikörper 11/78/1, wurde bei der DSM unter DSM ACC2211 am 26. April 1995 hinterlegt. 5

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den Abbau chromosomaler DNA in apoptotischen Zellen zu untersuchen. Diese Untersuchung kann an isolierten Körperflüssigkeiten einer Person durchgeführt werden. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann eine vorstehenden Abbau verantwortliche DNase nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen Protein ein gegen diese DNase gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Des Weiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für vorstehende DNase kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen. 10 15

Darüberhinaus eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für oder gegen Apoptose, zu ergreifen. Diese Maßnahmen umfassen die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Gegenstandes an eine Person. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann eine vorstehende DNase inhibiert werden, wodurch der Abbau von chromosomaler DNA verhindert wird. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen Protein, insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z. B. Transferrin oder BSA, dieser Abbau gefördert werden, was sich insbesondere zur Behandlung von Tumorzellen eignen würde. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben, z. B. Tumoren, induzierbaren Promoters gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Proteins in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibition einer vorstehenden DNase genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z. B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibition der für vorstehende DNase kodierenden Gens verwendet. 20 25

Die vorliegende Erfindung stellt somit einen großen Beitrag zur diagnostischen und therapeutischen Erfassung von Apoptose dar. 30

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig. 1 zeigt die Basensequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz eines erfindungsgemäßen Proteins mit DNase-Aktivität.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert. 35

Beispiel 1

Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Proteins

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins wurde die DNA von Fig. 1 als Template verwendet. Es wurde ein PCR-Verfahren durchgeführt. Als Primer-Paar wurde verwendet: 5'-CAGGGATCGATGACGAT-GACAAATGCACTACCCAAC TGCAC-3' und 5'-GGGGATCCTCAGGCAGCAGGGCACAG-3'. Der PCR-Ansatz bzw. die PCR-Bedingungen waren wie folgt: 40 45

PCR-Ansatz

Template DNA (Fig. 1): 1 µl = 1 ng
 Pfu-Polymerase 10x-Puffer: 10 µl = 1 x
 DMSO: 10 µl = 10%
 dNTP's: 1 µL = je 200 µM
 Oligonukleotide, je 1,5 µl: 3 µl = je 150 ng
 H₂O-bidest: ad 99 µl

50

50

50

PCR-Bedingungen

— 92°C — 5 min
 — Zugabe von 1 µl Pfu-Polymerase (Stratagene) = 2,5 Einheiten
 — Zugabe von Paraffin

55

55

55

PCR

60

60

60

65

5	92°C 1 min	}	1 Zyklus
	58°C 1 min		
	72°C 10 min		
10	92°C 1 min	}	39 Zyklen
	58°C 1 min		
	72°C 2 min		
15	72°C 10 min		1 Zyklus

Die amplifizierte DNA wurde mit Bamfil gespalten und in die einzige BamHI-Stelle des Expressionsvektors pQE-8 (Diagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/DNaseX erhalten. Dieses kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfundungsgemäßen Protein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQ/DNaseX wurde zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265–273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend den Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709–733).

Es zeigte sich, daß ein erfundungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

30 Beispiel 2: Herstellung eines erfundungsgemäßes Antikörpers

Ein erfundungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wurde eine 35 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

40 Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung wurden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- 45 Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
- Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
- Tag 80: Ausbluten.

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfundungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J. J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203–209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215–229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1 : 10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1 : 5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

60 Es zeigte sich, daß erfundungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

Pro Immunisierung wurden 40 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
- Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
- Tag 50: 3. Immunisierung (icFA).

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung wurden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

5

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

10

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)

Tag 87: Fusion.

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen. Einer davon, 11/78/1, wurde bei der DSM unter DSM ACC 2211 am 26. April 1995 hinterlegt.

15

Beispiel 3: Nachweis der DNase-Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins

Es wurde ein DNase-Aktivitätstest entsprechend des Verfahrens von Rosenthal, A.L. & Lacks, S.A., Anal. Biochem. 80, (1977), 76–90 mit Modifikationen durchgeführt. Hierzu wurde ein 18% SDS-Polyacrylamid-Gel hergestellt, das 2 mM EDTA und denaturierte Lachs-Testis DNA oder Hefe RNA bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml im Trenn- und Sammelgel enthielt. Proben wurden denaturiert, indem sie 4 min in Laemmli-Probenpuffer, der 5% 2-Mercaptoethanol enthielt, gekocht wurden. Als Proben wurde ein erfindungsgemäßes Protein (von Beispiel 1) und Rinder-DNase 1 (Kontrolle) verwendet. Als Proteinmarker wurde eine 10 kd Leiter (Gibco BRL) verwendet, die in dem gleichen Gel aufgetrennt wurde, nach der Elektrophorese ausgeschnitten und mit Coomassie-Blau angefärbt wurde. Zur Entfernung des SDS nach der Elektrophorese wurde das die Proben enthaltende Gel 4 × 30 min mit 100 ml 40 mM Tris-HCl, pH 7,6, gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in 40 mM Tris-HCl, pH 7,6, mit 0,02% Natriumazid und 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ bzw. mit 2 mM MgCl₂, 2 mM ZnCl₂ inkubiert. Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität wurde der Puffer gewechselt und Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 2 µg/ml hinzugegeben. Das Gel wurde periodisch auf einem langwelligen UV-Licht untersucht und photographiert.

20

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Protein eine DNase-Aktivität aufweist.

25

30

Patentansprüche

35

1. Protein mit DNase-Aktivität, umfassend die Aminosäuresequenz von Fig. 1, wobei Fig. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist, oder ein funktionelles Derivat oder Fragment davon.
2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA umfaßt
 - (a) die DNA von Fig. 1, wobei Fig. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist, oder einen Teil davon,
 - (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 - (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.
3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1.
7. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie von Apoptose.
8. Verwendung der DNA nach Anspruch 2 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie von Apoptose.

40

45

50

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

FIGUR 1